

University of Groningen

Bepaling van de productie van enkele steroiden bij patienten met aangeboren afwijkingen in de steroid stofwisseling.

Degenhart, Harm Jans

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

1968

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Degenhart, H. J. (1968). *Bepaling van de productie van enkele steroiden bij patienten met aangeboren afwijkingen in de steroid stofwisseling*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

SAMENVATTING

Inleiding (Hoofdstuk I). Het doel van het in dit proefschrift beschreven onderzoek was, bij een aantal patiënten met erfelijke stoornissen ("inborn errors of metabolism") in de bijnierschorsfunctie een indruk te krijgen omtrent de activiteit van enkele enzymen, betrokken bij de biosynthese van de steroidhormonen.

De door ons onderzochte patiënten kunnen in vier groepen worden verdeeld. Deze vier groepen zullen bij de samenvatting van Hoofdstuk VII nader worden beschreven.

Bovengenoemde problematiek werd op indirecte wijze benaderd, namelijk door gebruik te maken van radioactief gemerkte steroiden. Met behulp hiervan blijkt het mogelijk te zijn de dagelijkse secretie van een aantal relevante hormonen te bepalen (zogenaamde secretiesnelheid bepaling).

In *Hoofdstuk II* wordt zeer beknopt een overzicht gegeven van de structuur en de nomenclatuur der steroiden. Aan het eind van het proefschrift is bovendien een lijst opgenomen met de IUPAC-namen en de triviale namen van alle steroiden, die in dit proefschrift ter sprake komen.

In *Hoofdstuk III* wordt een beeld geschetst van de functie die de bijnierschors heeft.

Een aantal steroidhormonen wordt beschreven en de regulatie van hun secretie, van belang voor een goed begrip van de pathologie, in 't kort besproken. Achtereenvolgens zijn dit: hydrocortison, aldosteron, enkele C_{19} steroiden (de z.g. bijnierandrogenen en testosteron), corticosteron, desoxycorticosteron en 18-hydroxycorticosteron.

De rol, die de twee peptide-hormonen ACTH en angiotensine spelen in de regulatie van de bijnierschorsprocessen komt hierbij tevens ter sprake.

In *Hoofdstuk IV* wordt de biosynthese van de steroidhormonen behandeld. Deze verbindingen worden zoal niet geheel, dan toch wel grotendeels gevormd uit cholesterol. De ontstaanswijze van cholesterol uit C_2 -eenheden wordt daarom eerst gegeven.

De betrokken reacties zijn vooral onderzocht bij de rat. Grote verschillen tussen rat en mens in dezen zijn echter niet waarschijnlijk.

Aan de hand van de eigenschappen van de enzymen, die het cholesterol-molecuul omzetten tot hydrocortison, aldosteron etc. worden daarna deze routes beschreven. De steroidhormonen worden weer uitgescheiden na enkele omzettingen, die de hormonale activiteit geheel of voor een belangrijk deel doen verminderen.

Aansluitend bij deze beschrijving van opbouw en inactivering wordt de remmende werking beschreven, die vele steroiden blijken te hebben op enzymen die bij hun eigen biosynthese zijn betrokken. De betekenis van deze "feed-back" effecten is echter nog onduidelijk.

In *Hoofdstuk V* volgt een beschrijving van de storingen, die zich kunnen voordoen bij de steroidbiosynthese. Deze zijn alle naar de thans gangbare opvattingen te rangschikken in de categorie van de "inborn errors of metabolism" (Garrod). Hoewel deze aandoeningen zeldzaam zijn hebben ze relatief grote betekenis, a) door hun ernstige aard en b) door het feit dat ze belangrijk bijdragen tot onze kennis van de normaal voorkomende processen.

Ten tijde van de eerste fasen van ons onderzoek waren drie van deze "inborn errors" beschreven. Dit waren:

a) een stoornis in de steroid-21-hydroxylase, in de medische literatuur (viriliserende) congenitale bijnierhyperplasie of adrenogenitaal syndroom genoemd.

b) een stoornis in de steroid-11 β -hydroxylase. Dit ziektebeeld vertoont grote gelijkenis met het voorgaande, zij het dat hier dikwijls een hypertensie optreedt.

c) een stoornis in de 3 β -ol steroiddehydrogenase. Ook hier neemt men (althans bij meisjes) virilisatieverschijnselen waar, die overigens meestal van lichtere aard zijn dan stoornissen a) en b).

Thans zijn er zes met min of meer grote zekerheid gelocaliseerd. Enkele andere zijn gepostuleerd. Op p. 51 t/m 57 worden deze afwijkingen kort beschreven. Het boek van Wilkins (1965) is een goede introductie tot deze problematiek.

Bovengenoemde afwijkingen zijn direct terug te voeren op verminderde activiteit van een enzym met een synthetiserende functie. Er bestaan evenwel nog vele andere hormonale storingen, waarbij een dergelijke verminderde activiteit, (althans op dit ogenblik) niet is aangetoond.

Omdat er door ons twee aandoeningen uit deze laatste categorie zijn onderzocht, worden deze twee in *Hoofdstuk V* beschreven. Beide hebben ze betrekking op de productie van steroiden. Bij de eerste, pubertas precox, zijn diverse symptomen van een verhoogde productie van androgenen waar te nemen. Het beeld wordt nl. gekenmerkt door puberteitsverschijnselen bij kinderen, jonger dan 8 à 9 jaar (Wilkins, 1965). Indien er geen oorzaak (zoals b.v. een cerebrale tumor) valt aan te wijzen, noemt men het idiopathische pubertas precox. Deze symptomen van toegenomen androgenenproductie geven een aansluiting bij de verhoogde androgenenproductie, optredend bij de viriliserende congenitale bijnierhyperplasie.

De tweede aandoening, het z.g. syndroom van Bartter (Bartter et al., 1962; Pronove et al., 1960; Visser et al., 1967) wordt gekarakteriseerd door te lage K^+

spiegels in het plasma en te hoge pH van het bloed (hypokalemische alkalose). Daarnaast bestaat o.a. een relatieve ongevoeligheid voor angiotensine. Deze eerste drie kenmerken zijn altijd aanwezig; ook ziet men (dikwijls) dwerggroei. Deze aandoening wordt hier vermeld, omdat door ons een poging is gedaan om het beeld te verklaren als een partieel enzymdefect, optredend bij de vorming van aldosteron.

Na de inleidende hoofdstukken I t/m V, waarin enkele aspecten van de biochemie en de pathologie der bijnierschors worden beschreven volgt in *Hoofdstuk VI* de beschrijving van de methode, die centraal heeft gestaan tijdens ons hele onderzoek: de z.g. "secretiesnelheid" methode, dikwijls ook in ons taalgebied "secretion rate" methode genoemd. Deze werkwijze, voor het eerst op steroiden toegepast door Pearlman in 1957 en uitgewerkt door o.a. Tait (Tait en Burstein, 1964), is door ons gebruikt ter bepaling van de secretie of productie van bijnierschorssteroiden. Zij berust op het feit, dat de specifieke activiteit (uitgedrukt in $\mu\text{C}/\mu\text{g}$) van een (intraveneus toegediende dosis) radioactief steroid door de endogene productie van dat steroid daalt. De grootte van deze daling is een maat voor die endogene productie. Wiskundig valt hieruit een eenvoudige formule af te leiden, waardoor alleen het aantal microcuries, dat werd toegediend en de specifieke activiteit van een metaboliet benodigd zijn voor de berekening. (Gurpide et al., 1962).

De bij dit onderzoek meest frequent gebruikte termen worden gedefinieerd en de voorwaarden en beperkingen van de methode worden toegelicht.

Het gebruik van radioactieve stoffen was voor het onderzoek essentieel. Na een beschrijving van bereiding, zuivering en toediening van de gemerkte steroiden wordt daarom ook de meting zelf uitgebreid beschreven. Er werd steeds gebruik gemaakt van ^{14}C en ^3H . Deze β -stralers werden geteld in een vloeistofscintillatieteller.

De zuivering van de verschillende steroiden vond steeds plaats langs chromatografische weg. Er werd gebruik gemaakt van papier-, dunnelaag- en kolomchromatografie (Neher, 1964).

In het tweede deel van *Hoofdstuk VI* worden a) de eenvoudige chemische bepalingen en b) de meer gecompliceerde procedures beschreven. Onder a) vallen de simpele tests, die in korte tijd verricht kunnen worden en een eerste oriëntatie kunnen verschaffen.

Het zijn metingen van resp.:

- 1) 3β -hydroxy Δ^5 -steroiden
- 2) pregnaantriol
- 3) tetrahydro "S"
- 4) 17-ketosteroiden
- 5) C_{21} steroiden met een hydroxyacetongroep.

Onder b) valt de bepaling van de secretie of de productie van resp.:

- 1) hydrocortison
- 2) aldosteron
- 3) 18-hydroxycorticosteron

- 4) corticosteron
- 5) desoxycorticosteron
- 6) testosteron.

De hydrocortison- en corticosteronmetabolieten werden bepaald met chemische reacties. De overige secretie- en productiestudies werden gedaan m.b.v. radioactief azijnzuuranhydride.

De gebruikte metabolieten waren:

voor hydrocortison	THF, a-THF en THE,
voor aldosteron	pH-1 labiel glucuronide van aldosteron of 3 α -,5 β -tetrahydroaldosteron,
voor 18-hydroxycorticosteron	18-hydroxy THA
voor corticosteron	THB
voor desoxycorticosteron	THDOC
voor testosteron	vrij, glucuronide- en sulfaatgebonden testosteron(samengevoegd tot één fractie).

De methode voor de testosteronbepaling werd vrijwel geheel door ons ontworpen. De methodes voor 3 α -,5 β -tetrahydroaldosteron, 18-hydroxy THA, THDOC, THB, THF, a-THF en THE werden uit de literatuur overgenomen, maar moesten min of meer ingrijpend worden gewijzigd.

In *Hoofdstuk VII* worden de vier groepen patiënten, die door ons zijn onderzocht, met de bijbehorende vraagstelling, nader beschreven:

Het waren: Groep a). Kinderen met een te geringe activiteit van de steroïd-21-hydroxylase, een enzym dat noodzakelijk is voor de vorming van o.a. hydrocortison en aldosteron. Deze geringe activiteit heeft ten gevolge dat door compensatiemechanismen de bijnier sterk vergroot wordt en abnormale hoeveelheden androgene stoffen produceert. (zie b.v. Stempfel en Tomkins, in Stanbury et al., 1966).

Ca. 30% van deze kinderen is niet in staat op een zoutarm dieet de Na⁺ excretie voldoende te beperken.

De vraag was, of dit veroorzaakt werd door een te geringe aldosteronsecretie dan wel door de aanmaak van een "zoutuitscheidend" hormoon. Een abnormaal lage aldosteronsecretie zou verklaard kunnen worden uit een enzymdefect, ernstiger van aard dan dat van de kinderen, die hun Na⁺ excretie wel voldoende kunnen beperken.

Het bleek, dat bij de drie zoutverliezers uit deze groep een abnormaal lage aldosteronsecretie optrad, waarin na een zoutarm dieet slechts een zeer geringe stijging te zien was, niettegenstaande dalende Na⁺ spiegels in het bloed. De niet-zoutverliezers hadden normale aldosteronsecreties. Tijdens een zoutarm dieet trad een ca. 3-voudige stijging op, hetgeen normaal is. Hun Na⁺ balans bleef tijdens deze periode in evenwicht.

De hydrocortisonsecreties waren onder basale condities bij de zoutverliezers laag. ACTH-stimulatie had betrekkelijk weinig effect. De niet-zoutverliezers ver-

toonden onder basale omstandigheden een normale hydrocortisonsecretie, ACTH-stimulatie gaf een flinke stijging, die evenwel onder het normale bleef.

Groep b). Aansluitend bij het onder a) genoemde onderzoek werd bij een aantal van dezelfde kinderen de productie van testosteron bestudeerd. Hetzelfde gebeurde bij vier kinderen met een te vroeg intredende puberteit, de z.g. pubertas precox. De verschijnselen die optreden bij deze aandoeningen, maken het nl. waarschijnlijk dat hier een biologisch sterk werkzaam androgeen wordt aangeemaakt.

Uit het onderzoek bleek, dat zowel de testosteronexcretie (in de vorm van vrij testosteron + testosteronconjugaten, te splitsen door β -glucuronidase + sulfatase) als de testosteronproductie sterk waren toegenomen. Voor de congenitale bijnierhyperplasie valt te berekenen, dat evenwel slechts een betrekkelijk klein percentage als vrij testosteron wordt gesecerneerd door de bijnier.

Groep c). Enigszins anders was het onderzoek bij de derde categorie patiënten. Dit waren twee broers, lijdend aan een chronisch kalium- en natriumbrek, gepaard gaande met een te hoge bloed pH (hypokalemische alkalose) en dwerggroei. Dit beeld, in de literatuur voor het eerst uitgebreid beschreven door Bartter en medewerkers (Bartter et al., 1962), wekte het vermoeden dat hier een partieel enzymdefect, betrekking hebbende op de aldosteronsynthese, aanwezig was. (Pronove et al., 1960); Visser et al., 1967). De vraagstelling was: bestaat er een "partieel defect" in een enzym, betrokken bij de biosynthese van aldosteron, waardoor de som van alle mineralocorticoïde activiteiten abnormaal hoge waarden krijgt?

Hiertoe werd de secretie van de volgende steroïden bestudeerd:

DOC, corticosteron, 18-hydroxycorticosteron, aldosteron en hydrocortison. Het bleek, dat een dergelijk defect niet aantoonbaar was.

Groep d). Het vierde onderdeel van deze studie bestond uit het onderzoek van de urine van twee kinderen die evenals 30% van alle patiënten met een steroïd-21-hydroxylase deficiëntie bij beperking van de hoeveelheid keukenzout in hun voeding niet in staat waren de excretie van Na^+ in de urine voldoende te beperken. Een belangrijk verschil was echter dat bij deze kinderen géén virilisatie (vermannelijking) optrad. Het vermoeden bestond, dat een enzym, specifiek betrokken bij de biosynthese van aldosteron, in activiteit verminderd was. Door Visser en Cost (1964) was reeds vastgesteld, dat de omzetting corticosteron \longrightarrow aldosteron niet normaal verliep. De vraagstelling was: Welk van de twee enzymen, de steroïd-18-hydroxylase of de 18-hydroxysteroïd-dehydrogenase vertoont een afwijking?

Bij deze twee kinderen was het niet mogelijk secretie-studies te verrichten. Uit de excretie van twee steroïden, het 18-hydroxy THA en het $3\alpha,5\beta$ -tetrahydroaldosteron bleek echter, dat hoogstwaarschijnlijk bij deze kinderen de aldosteronsecretie zeer laag was, gepaard gaande met een laag-normale secretie van 18-hydroxycorticosteron.

SLOTCONCLUSIES

In de loop van vier jaren zijn door ons een aantal patiënten met diverse stoornissen in de bijnierschorsfunctie onderzocht. Gebruik makende van met ^3H of ^{14}C gemerkte steroïden werd op basis van het isotoopverduunningsprincipe secretie, productie of excretie van een aantal steroïdhormonen en metabolieten van deze hormonen bepaald. Door de betrekkelijk eenvoudige stofwisseling van de steroïden is het namelijk mogelijk op deze wijze een vrij exacte indruk te krijgen van de bijnierschorsactiviteit. Gezien de geringe hoeveelheden radioactief materiaal die benodigd zijn betekent de methode slechts een zeer geringe belasting voor de patiënt. Qua laboratoriumfaciliteiten is evenwel het tegengestelde waar.

Het beschreven onderzoek kan in vier delen worden gesplitst. Het gemeenschappelijke punt hierbij was, dat steeds een afwijking in de aanmaak van bijnierschorssteroïden het onderwerp van studie uitmaakte.

Resumerend zijn de genoemde vier delen:

a) Onderzoek van patiënten met een steroïd-21-hydroxylase stoornis. Deze zijn niet in staat bij normale ACTH-spiegels voldoende hydrocortison te maken. Door de feed-back tussen hypofyse en bijnier resulteert dit in verhoogde ACTH-afgifte door de hypofyse, hetgeen weliswaar de hydrocortisonsecretie op min of meer normaal niveau brengt, maar tevens een grote productie van androgenen tengevolge heeft, oorzaak van de bij deze afwijking optredende virilisatie. (Longson en Christy, 1964).

Uit de resultaten van het onderzoek kunnen de volgende conclusies worden getrokken:

1) Het feit, dat bij ca. 30% van deze kinderen een onvermogen bestaat om bij een lage Na^+ toevoer (zoutarm dieet) de Na^+ excretie in de urine te beperken, wordt veroorzaakt door een abnormaal lage aldosteronsecretie. Het is niet waarschijnlijk, dat de bijnier hier een steroïd vormt, dat actief de Na^+ excretie stimuleert. De "niet-zoutverliezer" heeft géén verlaagde aldosteronsecretie.

2) "Zoutverliezers" en "niet-zoutverliezers" zijn twee afzonderlijke genotypen; zeer waarschijnlijk tengevolge van verschillende, genetisch bepaalde afwijkingen in de steroïd-21-hydroxylase (analogie met de abnormale hemoglobines). In beide groepen is de hydroxylatie van de voorstadia van hydrocortison belemmerd.

Dit gaat bij de "zoutverliezers" gepaard met een sterke belemmering van de vorming van aldosteron uit een voorstadium, dat nog geen "21" hydroxylatie heeft ondergaan.

De bovengenoemde productie van androgenen was de aanleiding tot deel b) van het onderzoek. Dit aspect van het ziektebeeld heeft steeds sterk de aandacht getrokken (De Crecchio, 1865; Stempfel en Tomkins, in Stanbury et al., 1966). Uit het onderzoek van onze patiënten (grotendeels dezelfde als vermeld onder a) bleek, dat de productie van het biologisch zeer werkzame androgeen testosteron sterk was toegenomen. Dit, gecombineerd met gegevens uit de literatuur (Gandy et al., 1966) veroorzaakt echter tevens de conclusie dat slechts een betrekkelijk klein percentage van de testosteronproductie vrij, direct door de bijnier gesecerneerd testosteron is. Het leggen van een strikte correlatie tussen klinische symptomen en door ons verkregen getallen is echter niet zonder meer mogelijk.

Deel c) Uit het onderzoek van twee broers, beide lijdend aan het Bartter syndroom, een afwijking die o.a. gekarakteriseerd wordt door te hoge K^+ spiegels in het plasma en te lage pH van het bloed (Desmit, 1967; Visser et al., 1967; Pronove et al., 1960), konden de volgende conclusies worden getrokken:

De mineralocorticoïde activiteit, ontplooid door de bijnierschors (d.w.z. som van aldosteron + corticosteron + DOC + 18-hydroxycorticosteron) is verhoogd. Een partieel enzymdefect tussen corticosteron en 18-hydroxycorticosteron valt uit te sluiten.

De resultaten zijn te rijmen met het optreden van een in de proximale tubulus gelegen afwijking van de Na^+ resorptie.

Deel d) van het in dit proefschrift beschreven onderzoek omvatte de studie van twee kinderen, waarvan reeds bekend was, dat hun aldosteronsecretie minimaal was (Visser en Cost, 1964). Ook was bekend, dat er zeer waarschijnlijk een enzymdefect bestond in de steroid-18-hydroxylase, òf in de 18-hydroxysteroid-dehydrogenase.

Uit ons onderzoek van metabolieten der relevante steroiden (deze metabolieten waren het 18-hydroxy THA en het $3\alpha,5\beta$ -tetrahydroaldosteron) viel te concluderen: a) het "blok" moet zich bevinden tussen corticosteron en 18-hydroxycorticosteron. Deze afwijking was nog niet eerder beschreven, wel een stoornis in de dehydrogenase (Ulick et al., 1964); b) de ophoping van corticosteron geeft aanleiding tot remming van de 18-hydroxysteroiddehydrogenase. De marginale vorming van 18-hydroxycorticosteron is nu onvoldoende om de aldosteronsecretie op peil te houden.

Aansluitend op deze conclusies moeten nog enkele meer algemene punten worden aangestipt.

Het geringe aantal patiënten waarmee gewerkt kon worden, bemoeilijkte het trekken van algemene conclusies. Het feit b.v. dat slechts drie zoutverliezers

bestudeerd konden worden maakt het onderzoek minder volledig dan bij een getal van b.v. 50 het geval zou zijn geweest.

Ook de onmogelijkheid tijdens dit onderzoek bijnierweefsel te bestuderen noopt tot enig voorbehoud bij de conclusies. Het zou anders mogelijk zijn geweest met grotere zekerheid de eigenschappen van de steroid-21-hydroxylase bij "zoutverliezers" en "niet-zoutverliezers" te bespreken.

Hetzelfde geldt voor de gepostuleerde remming van de 18-hydroxysteroid-dehydrogenase.

Ondanks deze beperkingen, inherent aan de studie van de "inborn errors of metabolism", dient te worden opgemerkt dat een verdere bestudering van al deze patiënten het inzicht in de normale gang van zaken kan verdiepen. Slechts één voorbeeld zij hier genoemd: een studie van de secretie van compound "S" bij het "21" defect zou aantonen in hoeverre de remming van de 11β -hydroxylase door C_{19} steroiden normaliter betekenis heeft. De, uit menselijk oogpunt bezien, dikwijls minder geslaagde "experiments of Nature" kunnen op deze wijze toch een positieve betekenis krijgen.

SUMMARY

Introduction (Chapter I). The purpose of the investigation, described in this thesis, was to study the activity of some enzymes, concerned with the biosynthesis of the steroidhormones. Four groups of patients were included in the study. They will be discussed in the summary of Chapter VII.

The utilization of radioactive labeled steroids allowed for the estimation of the daily secretion of some important hormones (so-called secretion rate method), and consequently for an indirect assessment of enzyme activity.

In *chapter II* the structure and nomenclature of the steroids is reviewed very briefly. (A list with the IUPAC- and the trivial names of all steroids appearing in this thesis is also inserted in this thesis).

In *chapter III* the function of the adrenal cortex is outlined. Some steroidhormones are described: hydrocortisone, aldosterone, some C₁₉ steroids (the so-called adrenal androgens and testosterone), corticosterone, deoxycorticosterone and 18-hydroxycorticosterone. The role of the two peptide-hormones ACTH and angiotensin in the regulation of the secretion of these steroidhormones is also discussed.

Chapter IV describes the biosynthesis of the steroidhormones. They originate mainly if not completely from cholesterol, the synthesis of which is discussed first. The reactions involved have been examined most thoroughly in the rat. It is most likely however that no great differences exist between rat and man in this respect.

From the properties of the enzymes which transform the cholesterol molecule into hydrocortisone, aldosterone etc. the synthetic pathways are described. The excretion of the steroidhormones is preceded by some reactions which reduce or even abolish all hormonal activity. A description is given of these reactions. Finally the feed-back mechanisms are discussed by which many steroids can influence their own biosynthesis. The role of these feed-back effects is not clear as yet.

In *chapter V* a description is given of the aberrations occurring in the steroidbiosynthesis in man. They can be classified amongst the inborn errors of metabolism (Garrod). Although they are rare they have relatively much significance:

- a) because of the seriousness of the clinical picture
- b) because they contribute to our knowledge of the normal processes.

Three of these inborn errors had been described at the time we started our work:

- a) A deficiency of the steroid-21-hydroxylase; in the medical literature it is called virilizing congenital adrenal hyperplasia or adrenogenital syndrome. It is characterized by symptoms of virilization, deficient cortisol production with or without hypoaldosteronism.
- b) A deficiency of the steroid-11 β -hydroxylase. This syndrome is similar to the previous, with the difference that often hypertension is present.
- c) The 3 β -ol steroiddehydrogenase deficiency. It is characterized by a severe hypoaldosteronism, lack of complete virilization in the male and some signs of virilization in the female.

At this time six biochemical lesions have been localized more or less precisely. Some others have been postulated. These deficiencies are described on p. 50 .

The above-mentioned deficiencies are the direct result of the decreased activity of an enzyme with a synthesizing function. Many other hormonal aberrations exist however, which have not been correlated with a decreased enzyme activity. Two syndromes of this type examined by us are described. Both concern the production of steroids too. In the first, precocious puberty, symptoms of an increased androgen production are present. The syndrome is characterized by symptoms of puberty in children, less than 8-9 years old (Wilkins, 1965). When a direct cause can not be indicated (such as a cerebral tumour), it is called idiopathic precocious puberty. The second syndrome, the so-called Bartter-syndrome (Bartter et al., 1962; Pronove et al., 1960; Visser et al., 1967) is characterized by abnormally low K⁺ levels in the plasma and an abnormally high blood-pH (hypokalemic alkalosis). In addition, a relative insensitivity for angiotensin exists. These three characteristics are always present. Dwarfism is often but not always present. This syndrome is mentioned here, as we have tried to explain it on the basis of a partial enzyme deficiency in the aldosterone-synthesis.

After the introductory chapters I-V, in which some aspects of the biochemistry and pathology of the adrenal cortex are discussed, in *chapter VI* the most important method in our work; the estimation of secretion rates, is described. This method, introduced in steroid biochemistry by Pearlman in 1957 and elaborated i.a. by Tait (Tait and Burstein, 1964) has been used by us in order to estimate the secretion or production of adrenocortical steroids. This method is based on the following principle: The decrease of the specific activity (expressed in $\mu\text{C}/\mu\text{g}$) of an intravenously administered radioactive steroid is a function of the endogenous production of that steroid. One can derive a formula for which one needs to know only the amount of radioactivity administered and the specific activity of a metabolic (Gurpide et al., 1962). The terms most frequently used in this field are defined and the conditions and limitations of the technique are discussed. The preparation, purification and administration of the labeled steroid, and the measurement itself is described. The β emitters ^{14}C and ^3H were used throughout, and were counted in a liquid scintillation counter. The purification of the steroids was done by chromatography; paper-, thin layer- and

columnchromatography were used (Neher, 1964).

The second part of chapter VI describes:

a) The simple chemical measurement of some steroids:

- 1) 3β -hydroxy Δ^5 -steroids
- 2) pregnanetriol
- 3) tetra hydro "S"
- 4) 17-ketosteroids
- 5) C_{21} -steroids with a dihydroxy-acetone-group

These methods are simple, fast and can offer a first orientation.

b) The more complicated estimation of secretion and production of resp.:

- 1) hydrocortisone
- 2) aldosterone
- 3) 18-hydroxycorticosterone
- 4) corticosterone
- 5) deoxycorticosterone
- 6) testosterone.

The hydrocortisone- and corticosteronemetabolites were estimated by means of chemical reactions. The remaining excretion-, secretion- and production studies were done with the help of radioactive acetic anhydride.

The metabolites used were:

for hydrocortisone	THF, a-THF and THE
for aldosterone	pH-1 labile glucuronide of aldosterone or $3\alpha 5\beta$ tetrahydroaldosterone
for 18-hydroxycorticosterone	18-hydroxy THA
for corticosterone	THB
for deoxycorticosterone	THDOC
for testosterone	free, glucuronide- and sulfate bound testosterone (combined)

The testosterone-assay was for a large part our own design. The essays of $3\alpha 5\beta$ tetrahydroaldosterone, 18-hydroxy THA, THDOC, THB, THF, a-THF and THE were modifications from methods described in the literature.

Chapter VII describes the four groups of patients included in the investigation. Group a). Children with a steroid-21-hydroxylase deficiency. This enzyme is necessary for the synthesis of hydrocortisone and aldosterone, amongst others. Through a compensatory mechanism, the adrenal gland enlarges, and abnormal quantities of androgenic substances are produced. (See a.o. Stempfel and Tomkins, in Stanbury e.a., 1966).

Approximately 30% of these children are unable to limit their Na^+ -excretion when placed on a low-salt diet. The question whether this is due to a deficiency in the aldosterone secretion rather than to the synthesis of a "salt-loss-promoting hormone", was investigated. We were able to show that the three saltlosers in this group had abnormally low aldosterone secretion rates, which increased only slightly during a low-salt diet with decreasing natremia. The non-saltlosers to the contrary had normal aldosterone secretion rates. A three-fold rise was observed

during a low-salt diet, and the Na^+ -balance remained stable.

In saltlosers the baseline hydrocortisone secretion was low and was barely affected by ACTH-stimulation. The non-saltlosers showed normal baseline hydrocortisone secretion. ACTH-stimulation resulted in a subnormal albeit significant rise.

Group b). In four children with precocious puberty the production of testosterone was estimated. The symptoms of virilization in these children suggest the presence of a highly active androgen. The same measurement was done in most of the children from group a).

It was shown that as well the production as the excretion of testosterone (in free form and as conjugates, hydrolysable by β -glucuronidase) were greatly increased. It was computed that in congenital adrenal hyperplasia free testosterone represents only a small fraction of the total amount produced by the adrenal gland.

Group c). The investigation of these patients was slightly different. Two brothers were studied who presented with a chronic hyponatremia, hypokalemic alkalosis, and dwarfism. This syndrome was first described in detail by Bartter and coworkers (Bartter et al., 1962). Some of its features suggested to us a partial enzyme deficiency in the aldosterone biosynthesis (Visser et al., 1967). In other words: does a "partial" deficiency exist in an enzyme, concerned with the biosynthesis of aldosterone, resulting in an abnormally high mineralocorticoid activity? To test this hypothesis the secretion 18-hydroxysteroiddehydrogenase. We were unable to perform secretion studies in these two aldosterone and hydrocortisone. No deficiency could be demonstrated.

Group d). Two children were studied, who presented with a limited capacity for Na^+ retention during restriction of the dietary NaCl -intake. The same phenomenon is observed in 30% of all patients with a steroid-21-hydroxylase deficiency. These two children however did not show any virilisation. This suggested a decreased activity of an enzyme, specifically concerned with the biosynthesis of aldosterone.

Visser and Cost (1964) had already concluded, that the reaction corticosterone \longrightarrow aldosterone was inhibited in these patients. The question remained which of the two enzymes was deficient: the steroid-18-hydroxylase or the 18-hydroxy-steroiddehydrogenase. We were unable to perform secretion studies in these two children. From the measurement of the excretion of two steroids, viz. 18-hydroxy THA and $3\alpha 5\beta$ tetrahydroaldosterone however, it was concluded that most probably the aldosterone secretion as well as the 18-hydroxycorticosterone secretion was too low in these children.

FINAL CONCLUSIONS

In a period of four years we examined a series of patients with several abnormalities in the function of the adrenal cortex. Utilizing ^3H or ^{14}C labeled steroids, the isotope dilution principle allowed for an estimation of the secretion, production or excretion of some steroidhormones. Because of the relatively simple metabolism of the steroids, a rather exact impression of the activity of the adrenal cortex can be obtained. Since the amount of radioactivity used is very small, this technique affects the patient in a minor way. As to the laboratory facilities however, the contrary is true.

The investigation, described in this thesis, can be divided in 4 sections with one common aspect: deficiencies in the synthesis of adrenocortical steroids.

Part a). Patients with a steroid-21-hydroxylase deficiency. These patients are unable to synthesize sufficient amounts of hydrocortisone in the presence of normal ACTH-levels. This results in an increased ACTH secretion by the pituitary (pituitary - adrenal feed-back). More or less normal amounts of hydrocortisone are then secreted, but concomitantly the androgen production rises sharply. This causes the virilization observed in this disease (Longson and Christy, 1964).

The results of our work allow for the following conclusions:

- 1) the disability of approximately 30% of these children to limit their Na^+ excretion in the urine during a low-salt diet is caused by an abnormally aldosterone secretion. It is unlikely that the adrenal produces a steroid which actively stimulates the Na^+ excretion. The "non-saltloser" has no decreased aldosterone secretion.
- 2) "salt-losers" and "non-saltlosers" represent two separate genotypes; most probably as a result of different, genetically determined defects in the steroid-21-hydroxylase (analogous to the hemoglobins). In the first group both the hydroxylation of the hydrocortisone precursor and the synthesis of aldosterone from a precursor, which did not yet undergo "21" hydroxylation are severely limited.

The above-mentioned overproduction of androgens induced part b) of the investigation. This aspect of the syndrome has been focused on by many investigators (De Crecchio, 1865; Stempfel and Tomkins, in Stanbury et al., 1966).

The studies in our patients showed a sharply increased production of the androgenic hormone testosterone. When these results were combined with data from the literature (Gandy et al., 1966), it was possible to show that only a relatively small percentage of the testosterone production represents free testosterone, directly secreted by the adrenal.

More than a rough correlation between the degree of virilisation and the values obtained could not be established.

Part c). Two brothers suffering from Bartter's syndrome were investigated. This disease is characterized i.a. by hypokalemic alkalosis (Desmit, 1967; Visser et al., 1967; Pronove et al., 1960). It was concluded that the mineralocorticoid activity, i.e. the sum of aldosterone, corticosterone, DOC and 18-hydroxycorticosterone was increased. A partial enzymatic defect between corticosterone and aldosterone could be excluded. The results are compatible with a defect in the Na^+ reabsorption situated in the proximal tubule.

Part d). Two children with an abnormally low aldosterone excretion were studied. Visser and Cost (1964) had shown that most likely a defect existed in either the steroid-18-hydroxylase or the 18-hydroxysteroiddehydrogenase.

Two conclusions could be drawn from the excretion of 18-hydroxy THA and tetrahydroaldosterone:

a) The formation of 18-hydroxycorticosterone from corticosterone is inhibited. This deficiency had not previously been described. (A defect in the 18-dehydrogenase was demonstrated by Ulick et al in 1964).

b) The accumulation of the precursor corticosterone may cause an inhibition of the 18-hydroxysteroiddehydrogenase. The marginal amount of 18-hydroxycorticosterone formed is inadequate for a normal aldosterone secretion.

In addition to these conclusions some general points should be made. The relatively small number of the patients investigated limited the drawing of general conclusions. From fifty saltlosers can be obtained more information than from three!

The impossibility to obtain adrenal tissue from these patients for in-vitro studies prevents the direct investigation of the properties of the enzymes involved. Such an approach might be revealing for example for the differences between saltlosers and non-saltlosers.

The same applies to the postulated inhibition of the 18-hydroxysteroiddehydrogenase.

Notwithstanding these restrictions, inherent to the study of many inborn errors of metabolism, it should be noted, that a further investigation of these patients can contribute much to our knowledge of the normal processes. One example: a study of the secretion of compound "S" in the "21" deficiency could demonstrate the importance of the inhibition of the 11β hydroxylase bij C_{19} steroids under normal circumstances.

This way the often cruel "experiments of Nature" may even acquire a positive meaning for mankind.